

Herziene Wet op de Dierproeven: het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren

Versie : 7 oktober 2016

Contents

I. Doel van deze notitie	1
II. Wanneer is er sprake van een Genetische modificatie (GM)/ Genetische wijziging (GW)?:	2
III. Het genereren van een nieuw gewijzigd genotype	2
IV. Wanneer is er bij een gewijzigd genotype sprake van een aangetast fenotype?	3
V. Wanneer is er sprake van een ‘fok met ongerief’?	4
VI. Monitoring van een nieuw gegenereerd genotype	6
VII. Schema en tabel met voorbeelden.	8
VIII. Overzichtschema	17
IX. Annex welfare assessment	20
X. Artikelen	21

I. Doel van deze notitie

Het ‘*working document on genetically altered animals*’ uit 2013 is een consensus document ter ondersteuning van de interpretatie van de Europese Richtlijn. Dit document omvat een definitie van een genetisch gemodificeerd dier, gaat in op de vraag wanneer het genereren, fokken en monitoren van genetisch gemodificeerde dieren vergunningplichtig zou zijn en wanneer er sprake is van een aangetast fenotype. Het betreft een aanbeveling en heeft dientengevolge geen wettelijke status. In overleg met de CCD, NVWA en EZ is besloten dat Nederland op punten zal afwijken van het consensus document.

Er zijn daarnaast verplichtingen met betrekking tot de registratie rond het genereren, fokken en gebruiken van genetisch gemodificeerde dieren (Uitvoeringsbesluit: *Discussion paper for the purposes of promoting consistent reporting of statistical data (actual severity and animal numbers) under Article 54(2) of Directive 2010/63/EU and Commission Implementing Decision 2012/707/EU*).

Doel van deze notitie is inzicht te verschaffen in welke handelingen rond het genereren, het fokken, het monitoren en de huisvesting van dieren met veranderingen in hun genoom in de Nederlandse situatie vergunningplichtig zijn en in welke situaties er sprake is van een registratie verplichting van dierproeven en/of proefdieren.

II. Wanneer is er sprake van een Genetische modificatie (GM)/ Genetische wijziging (GW)?:

In het Uitvoeringsbesluit 2012/707 is het begrip *'genetisch gewijzigde dieren'* ingevoerd:

'Ten behoeve van de statistische rapportage omvatten „genetisch gewijzigde dieren” zowel genetisch gemodificeerde (transgene, knock-out, knock-in en anderszins genetisch gewijzigde) dieren als dieren met spontane of geïnduceerde mutaties'

Nakomelingen van één of beide genetisch gewijzigde ouderdieren, die zelf de mutatie niet bezitten (wildtype-dieren) worden niet beschouwd als *'genetisch gewijzigd'*.

Iedere genetische verandering met kiembaan transmissie, dus ook een spontane mutatie die (bedoeld of onbedoeld, met al of niet een aangetast fenotype) in een lijn in stand wordt gehouden is per definitie *'een wijziging'*. Er wordt daarom bij de beoordeling/toetsing (IvD, DEC, CCD), de handhaving en de registratie geen onderscheid gemaakt omtrent de aard en oorsprong van een genetische modificatie bij een lijn die wordt aangehouden. Als bijvoorbeeld een lijn een erfelijke microphthalmie (kleine ogen) of anophthalmie (geen ogen) vertoont, dan wordt dit beschouwd als een lijn met een aangetast fenotype, ongeacht of dit fenotype herleidbaar is tot de genetische wijziging waarvoor de lijn oorspronkelijk is gegenereerd.

III. Het genereren van een nieuw gewijzigd genotype

Het ongeriefkader dat bepaalt of er bij een handeling aan een proefdier in het kader van één van de doelstellingen zoals aangegeven in de Wet op de Dierproeven (Wod) sprake is van dierproef staat beschreven in artikel 1 lid 1 sub a. Deze definitie is letterlijk overgenomen uit de EU Directive:

Elk al dan niet invasief gebruik van een dier voor experimentele of andere doeleinden, waarvan het resultaat bekend of onbekend is, of onderwijskundige doeleinden, die bij het dier evenveel of meer pijn, lijden, angst of blijvende schade kan veroorzaken als, dan wel dan het inbrengen van een naald volgens goed diergeneeskundig vakmanschap.

In dit artikel wordt de definitie van een dierproef uitgebreid met:

en het in een dergelijke toestand (= situatie met drempel overschrijdend ongerief) brengen en houden van een genetisch gemodificeerde dierenlijn.

Toelichting:

'brengen' dient te worden geïnterpreteerd als *'het genereren van'*

'houden' dient te worden geïnterpreteerd als *'het fokken met'*.

In het corrigendum wordt ook aangegeven dat *'creation of a new genetically altered line requires a project authorization'*.

Deze notitie heeft alleen betrekking op het genereren van een nieuw genotype met het doel om hiermee door te fokken (een lijn op te zetten). Het kruisen van twee lijnen met het enige doel om met de F1 dieren experimenten te gaan doen valt dus buiten deze notitie omdat deze fok niet het doel heeft een nieuwe lijn op te zetten

Er zijn vier manieren (zie ook figuur 1) om een lijn met een nieuw gewijzigd genotype te genereren nl:

- A. Het kruisen van twee genetisch gewijzigde lijnen
- B. Het ontstaan van een spontane mutant
- C. Chemische mutagenese
- D. Biotechnologische handelingen (transgenen, knock-outs, knock-ins)

Bij de Nederlandse implementatie van de Wod worden artikel 1a en het corrigendum zodanig uitgelegd dat het genereren van een nieuw genetisch gewijzigd genotype vergunningplichtig is als:

1. Er bekend (aangenomen kan worden) dat bij de te genereren dieren een aangetast fenotype zal ontstaan.
2. Voor het genereren van een nieuw genetisch gewijzigd genotype handelingen aan proefdieren worden uitgevoerd waarbij sprake is van richtlijn overschrijdend ongerief. Bijvoorbeeld het superovuleren van eiceldonoren, het vasectomeren van mannelijke dieren en het implanteren van embryo's in foster dieren. Om deze reden is het genereren van een genetisch gemodificeerde zebravissenlijn middels DNA injectie in zygoten geen dierproef in de zin van de Wet. Hierbij hoeven geen handelingen aan proefdieren resulterend in drempel overschrijdend ongerief te worden uitgevoerd. Daarentegen is het genereren van een nieuw genetisch gewijzigde zebravislijn via bijvoorbeeld ENU-mutagenese weer wel vergunningplichtig omdat er bij de gemutageniseerde mannelijke dieren sprake is van drempel overschrijdend ongerief.

In de wettelijke verplichte jaarlijkse NVWA registratie dienen dierproeven welke uitgevoerd worden in het kader van het genereren van een nieuwe genetisch gewijzigde lijn opgenomen te worden onder de doelstellingen '*Fundamenteel onderzoek*' of '*Toegepast onderzoek*' afhankelijk van het toepassingsgebied waarvoor de lijn gegenereerd wordt.

Het aanhouden van een lijn met aangetast fenotype (zie hieronder) valt in de registratie onder de doelstelling '*Maintenance of colonies of established genetically altered animals, not used in other procedures*' .

IV. Wanneer is er bij een gewijzigd genotype sprake van een aangetast fenotype?

Bij het bepalen wanneer (en of) er sprake is van een vergunningplicht zijn de volgende definities van belang (zie ook het overzichtsschema in hoofdstuk VIII):

- **Aangetast fenotype:** inherent aan de genetische achtergrond van de dieren is er sprake van een welzijnsaantasting die evenveel of meer pijn, lijden of angst met zich meebrengt als het inbrengen van een naald volgens goed diergeneeskundig vakmanschap.
- **Lijn met aangetast fenotype:** een lijn waarbij bij alle of bepaalde dieren (bijvoorbeeld alle homozygote dieren of een deel daarvan) altijd of in een bepaalde levensfase sprake is van een aangetast fenotype (=een bovendrempelige welzijnsaantasting).

NB. De kwalificatie 'een lijn met een aangetast fenotype' hoeft dus niet te betekenen dat alle dieren van die lijn ook werkelijk met deze welzijnsaantasting worden geconfronteerd.

NB. Wanneer er maatregelen worden genomen (aangepaste huisvesting, een beperkte levensduur (gedood voordat de genetische modificatie resulteert in welzijnsproblemen) of een andere op zich zelf niet tot bovendrempelig ongerief aanleiding gevende behandeling van dieren (bijvoorbeeld toediening via voer) waardoor er bij de betreffende dieren geen sprake meer is van welzijnsaantasting ten gevolge van de genetische achtergrond **blijft er sprake van een lijn met een aangetast fenotype.**

- **Dier met aangetast fenotype:** Dit is een dier dat tijdens het leven geconfronteerd wordt met een aangetast fenotype (=een bovendrempelige welzijnsaantasting).

NB. Wanneer er maatregelen worden genomen (aangepaste huisvesting, een beperkte levensduur (gedood voordat de genetische modificatie resulteert in welzijnsproblemen) of een andere op zich zelf niet tot bovendrempelig ongerief aanleiding gevende behandeling van dieren (bijvoorbeeld toediening via voer) waardoor er bij de betreffende dieren geen sprake meer is van welzijnsaantasting ten gevolge van de genetische achtergrond worden **deze dieren niet beschouwd als dieren met een aangetast fenotype.**

Zoals hierboven aangegeven is er in dit soort situaties **wel sprake van een lijn met een aangetast fenotype.**

V. Wanneer is er sprake van een 'fok met ongerief'?

Er is sprake van een fok met ongerief als er bij de fokdieren en/of de nakomelingen sprake is van dieren met een aangetast fenotype (=bovendrempelige welzijnsaantasting). Zie ook het overzichtsschema in hoofdstuk VIII

Voorbeelden:

a. Fok met ongerief:

- Bij de ouderdieren is sprake van een aangetast fenotype
- Bij de ouderdieren is geen sprake van een aangetast fenotype (bijvoorbeeld omdat ze heterozygoot zijn). Bij de homozygote pups is vanaf het moment van geboorte (of zelfs al gedurende het laatste derde deel van de zwangerschap) sprake van een (niet lethaal) aangetast fenotype. Dit is direct na de geboorte identificeerbaar en de betreffende pups worden dan direct gedood.
- Bij de ouderdieren is geen sprake van een aangetast fenotype (bijvoorbeeld omdat ze heterozygoot zijn). De (homozygote) pups met een aangetast fenotype overlijden tijdens of direct na de bevalling.
- Een fok met immuundeficiënte muizen in een conventionele unit (*dit wordt gezien als een onwenselijke situatie*).

b. Geen fok met ongerief:

- Bij de ouderdieren is geen sprake van een aangetast fenotype omdat ze heterozygoot zijn. De (homozygote) pups/nakomelingen worden afgemaakt voordat ze geconfronteerd worden met een aangetast fenotype (bijvoorbeeld na genotypering of op indicatie dat ze kleiner zijn en dit (nog) niet gepaard gaat met aantasting van hun welzijn).

NB. De nakomelingen die in experiment gaan en waarbij er tijdens het experiment wel sprake is van een aangetast fenotype vallen buiten de scope van deze notitie. Voor deze experimenten is vanzelfsprekend een projectvergunning noodzakelijk waarbij het ongerief ten gevolge van het aangetaste fenotype is meegewogen.

- Bij de ouderdieren is geen sprake van een aangetast fenotype omdat ze in fok gezet worden voordat ze geconfronteerd worden met de nadelige gevolgen van de genetische modificatie. De fokdieren en surplus dieren worden gedood voordat er sprake is van een aangetast fenotype (bijvoorbeeld het ontstaan van tumoren of ernstige neurologische verschijnselen).

NB. De nakomelingen die in experiment gaan in de periode dat er wel sprake is van een aangetast fenotype vallen buiten de scope van deze notitie. Voor deze experimenten is vanzelfsprekend een projectvergunning noodzakelijk waarbij het ongerief ten gevolge van het aangetaste fenotype is meegewogen.

- Een fok met immuundeficiënte muizen in een adequaat barrière systeem

Volgens Artikel 1a (Wod) wordt het in stand houden van een 'fok met ongerief' beschouwd als een dierproef en is dus vergunningplichtig.

Belangrijk:

Voor het al dan niet vergunningplichtig zijn van een fok met genetisch gewijzigde dieren hanteert de CCD het uitgangspunt dat de vergunningplicht pas van kracht wordt op het moment dat op basis van de welzijnsevaluatie is vastgesteld dat er sprake is van een 'fok met ongerief'.

Hiermee wordt afgeweken van het consensus document:

A creation of a new genetically altered line requires a project authorisation until such time when the line is "established" (zie VI)

In het consensus document en ook in de richtlijn (artikel 40.4¹) is de optie opgenomen dat voor de doelstelling '*Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures*' generieke (=paraplu) vergunningen zouden kunnen worden afgegeven:

Maintenance: the use of animals for the maintenance of colonies of genetically altered established lines, with a likely harmful phenotype, requires a project authorisation.

However, this could be considered under multiple generic authorization.

NB. Het gaat bij dit soort vergunningen dus uitsluitend om de fok van GW lijnen waarbij aangetoond is dat er sprake is van een aangetast fenotype. Het aanhouden van GW lijnen waarbij geen sprake is van een aangetast fenotype of lijnen die nog in de monitoring fase zitten ('*not established yet*'; zie VI) is niet vergunningplichtig.

¹ **Artikel 40.4:** De lidstaten kunnen toestaan dat vergunningen betrekking hebben op meerdere, door dezelfde gebruiker uitgevoerde generieke projecten, wanneer die projecten nodig zijn om aan wettelijke voorschriften te voldoen of wanneer in die projecten volgens aanvaarde methoden dieren worden gebruikt voor productie- of diagnosedoeleinden.

De voorwaarden waaraan naast de gebruikelijke eisen een dergelijke fok-projectvergunning moet voldoen zijn gepubliceerd in een apart kader stellend document (titel?). Dit document geeft inzicht in 'de spelregels en speelruimte' bij het opstellen en gebruik van dit soort generieke fok-vergunningen. In zijn definitieve vorm zal dit document als bijlage in deze notitie worden opgenomen.

VI. Monitoring van een nieuw gegeneerd genotype

Voor elk nieuw genotype waarvan besloten wordt dit als een lijn aan te houden, is er de verplichting tot het monitoren van het welzijn van de eerste 2 generaties. In afwijking van wat beschreven staat in het consensus document (Zie hoofdstuk V) is in Nederland besloten dat dit monitoren niet vergunningplichtig is. De dieren betrokken bij deze monitoring hoeven dus ook niet in een projectvergunning te worden opgenomen.

Deze dieren worden uiteindelijk wel opgenomen in de registratie 'Proefdieren', maar de monitoring zelf dus niet in de registratie 'Dierproeven'.

NB.

Uitgangspunt hierbij is wel dat bij de dieren en/of de handelingen in het kader deze monitoring **geen sprake is van drempel overschrijdend ongerief**. De monitoring van heel oude dieren of met behulp van handelingen met drempel overschrijdend ongerief (bloedafnames, belastende gedragsexperimenten etc.) is **wel vergunningplichtig** en deze monitoring dient ook **wel in de registratie** dierproeven te worden opgenomen (zie ook de tabellen met voorbeelden).

Na afloop van de monitoringperiode wordt vastgesteld of er al of niet sprake is van een lijn met een aangetast fenotype. Er is vervolgens sprake van een 'established' lijn. Dit betekent dat het duidelijk is of er bij het aanhouden van deze lijn al dan niet sprake is van een 'fok met ongerief' en dus van een vergunningsplicht.

Cre en lox lijnen zijn van deze verplichte monitoring uitgezonderd.

In het consensus document staat over deze monitoring en de registratie:

- *A new strain or line of genetically altered animals is considered to be "established" when transmission of the genetic alteration is stable, which will be a minimum of two generations, and an initial welfare assessment completed*
- *The welfare assessment will determine if the newly created line is expected to have a likely harmful phenotype and the animals from this point onwards shall be reported under category 'Maintenance of colonies of established genetically altered animals, not used in other procedures' – or in the other procedures they are being used for. If the welfare assessment concludes that the line is not expected to have a harmful phenotype, its breeding falls outside the scope of a procedure.*

In hoofdstuk VII is de annex uit het consensus document opgenomen waarin de uitvoering van de welzijnsmonitoring en de klinische parameters die daarbij dienen te worden bepaald zijn beschreven.

Deze monitoring periode dient formeel te worden afgesloten. De conclusie of er al of niet sprake is van een 'fok met ongerief' wordt bevestigd bij de IvD.

Omdat er op punten wordt afgeweken van het consensus document kunnen er situaties ontstaan waarin er bij het genereren van een nieuwe lijn (onverwacht) sprake is van een fok met ongerief en dus van een vergunningsplicht.

Voorbeelden:

1. In een project vergunning is voor een aantal lijnen in een 'fok met ongerief' voorzien. Het aantal dieren betrokken bij 'fok met ongerief' of het aantal lijnen met 'fok met ongerief' blijkt hoger te zijn dan wat daarvoor in de projectvergunning is opgenomen. De welzijnsaantasting van de nieuwe lijn(en) is conform wat daar in de projectvergunning voor is opgenomen.
Het is de intentie om projectvergunningen voor het aanhouden van lijnen met een aangetast fenotype op een dusdanig laag detail niveau te beschrijven dat het toevoegen van een lijn niet direct tot wijzigingen gaat leiden, zolang het aantal lijnen binnen de aangevraagde kaders van het aantal dieren en het ongerief blijft. Er wordt als voorwaarde aan een dergelijke vergunningaanvraag verbonden dat er jaarlijks een rapportage op basis van de getallen die noodzakelijk zijn voor de NVWA registratie ingediend wordt bij de CCD.
2. Een nieuw genotype is gegenereerd door het kruisen van twee lijnen beide zonder aangetast fenotype. Het is de bedoeling om met dit nieuwe genotype een lijn op te zetten. In de vergunning is geen 'fok met ongerief' opgenomen omdat dit niet verwacht was. Er wordt nu bij de fok voor het aanhouden van dit nieuwe genotype wel een 'aangetast fenotype' gevonden direct na de geboorte in een deel van de mannelijke nakomelingen. Er is nu dus sprake van een niet voorziene 'lijn met een aangetast fenotype' en een niet voorziene 'fok met ongerief'. Deze laatste is vergunningplichtig. (*zie ook het overzichtsschema in hoofdstuk VIII*). Er zijn geen consequenties voor de experimentele dieren want de experimenten kunnen worden uitgevoerd met vrouwelijke dieren.
In het geval er binnen de instelling een generieke vergunning voor het fokken van lijnen met een aangetast fenotype aanwezig is zou deze lijn wellicht hier kunnen worden onder gebracht. Is dit niet het geval dan moet de fok middels een wijzigingsaanvraag bij de projectvergunning worden ingediend en de fok worden stopgezet tot deze wijziging vergunning is verleend.
3. Het betreft een fok voor het aanhouden van een nieuw genotype en om dieren te fokken die gebruikt worden in experimenten waarbij geen sprake is van drempel overschrijdend ongerief. Er is dus voor dit onderzoek geen projectvergunning aangevraagd. Er blijkt nu sprake te zijn van een niet voorziene 'lijn met een aangetast fenotype' en een niet voorziene 'fok met ongerief'. In het geval er binnen de instelling een generieke vergunning voor het fokken van lijnen met een aangetast fenotype aanwezig is zou deze lijn hieronder kunnen worden gebracht. Is dit niet het geval dan moet met de fok gestopt worden tot er een vergunning is verkregen.

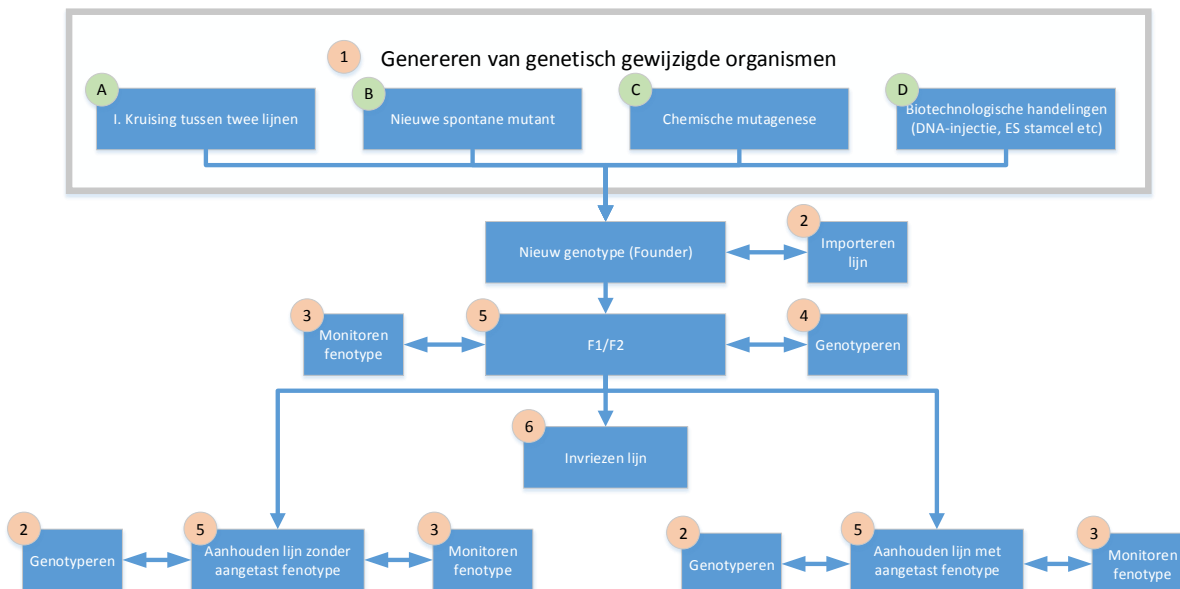
NB.

In het geval van de fok met een GW lijn met een aangetast fenotype hangt het af van de omstandigheden hoe deze in deze registratie terecht komt en wat de consequenties zijn voor de vergunning. Als er in een fok zowel bij de heterozygote als bij de homozygote dieren sprake is van een aangetast fenotype worden deze beide groepen dieren zowel in de registratie GW proefdieren als de registratie GW dierproeven opgenomen en vallen ze ook beide onder de (tellers in de) fokvergunning voor de fok van de betreffende lijn. De Wt dieren (zonder aangetast fenotype) worden alleen opgenomen in de registratie 'gewone' proefdieren en zijn geen onderdeel van de fokvergunning. In de situatie dat er alleen bij de homozygoten dieren (en niet bij de heterozygote dieren) sprake is van een aangetast fenotype worden alleen deze homozygote dieren opgenomen in zowel de registratie GW proefdieren als de registratie GW dierproeven en vallen ook alleen zij onder de (tellers in de) fokvergunning. De heterozygote dieren worden opgenomen in de registratie GW proefdieren en de Wt dieren in de registratie 'gewone' proefdieren. Beide zijn geen onderdeel van de fokvergunning. (Zie ook de voorbeelden in hoofdstuk VII onder 5 (aanhouden lijn))

VII. Schema en tabel met voorbeelden.

In onderstaande figuur is samengevat op welke dieren en op welke handelingen deze notitie betrekking heeft.

De nummers hebben betrekking op de verschillende (groepen) handelingen en refereren naar de verschillende tabellen met voorbeelden. Hieruit volgt wanneer een projectvergunning aangevraagd moet worden en op welke wijze de dieren geregistreerd dienen te worden in de jaarlijkse registratie van de NVWA.



Figuur 1: schematische weergave creëren en aanhouden genetisch gewijzigde organismen.

1 Actie: Creëren nieuw genotype		Project vergunning plichtig	In registratie Dierproeven	In registratie proefdieren	Toelichting
A. Kruisen van twee GW lijnen met het doel het genereren van een nieuwe lijn.	Ouderdieren (founders, <i>geen sprake van aangetast fenotype</i>)	Nee	Nee	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren
	Ouderdieren (founders, <i>bij één of beide ouderdieren is sprake van aangetast fenotype</i>)	Ja	Ja**)	Ja*)	*) In registratie GW/'gewoon' proefdieren **) In registratie GW dierproeven
	Nakomelingen (F1 en verder) <i>Er is niet de verwachting op dieren met een aangetast fenotype en het is ook na twee generaties monitoren niet geconstateerd.</i>	Nee	Nee	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren
	Nakomelingen (F1 en verder) <i>Er is de verwachting op een aangetast fenotype of dit is in de monitoring van de eerste twee generaties geconstateerd</i>	Ja	Ja**)	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren **) In registratie GW dierproeven
B. Spontane mutant identificeren, bepalen of afwijking erfelijk is en daarna opzetten van een lijn.	Ouderdieren (<i>Bij ouderdieren geen aangetast fenotype</i>)	Nee	Nee	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW dieren/dierproeven als gebleken is dat afwijking vererft
	Ouderdieren (<i>Bij één of beide ouderdieren is sprake van een aangetast fenotype</i>)	Ja	Ja	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW dieren/dierproeven als gebleken is dat afwijking vererft

1 Actie: Creëren nieuw genotype		Project vergunning plichtig	In registratie Dierproeven	In registratie proefdieren	Toelichting
	Nakomelingen (F1 en verder) <i>Er is niet de verwachting op dieren met een aangetast fenotype en het is ook na twee generaties monitoren niet geconstateerd.</i>	Nee	Nee	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren
	Nakomelingen (F1 en verder) <i>Er is de verwachting op een aangetast fenotype of dit is in de monitoring van de eerste twee generaties geconstateerd</i>	Ja	Ja**)	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren **) In registratie GW dierproeven
C. chemische mutagenese	Gemutageniseerde mannen (Wt of gewoon)	Ja	Ja	Ja	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon'
	Gemutageniseerde GW mannen	Ja	Ja**)	Ja*)	*) In registratie GW proefdieren **) In registratie GW dierproeven
	♀ voor F1 generatie	Nee	Nee	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon'
	♀ voor F1 generatie (GW)	Nee	Nee**)	Ja*)	*) In registratie GW proefdieren **) Geen aangetast fenotype
	Uitkruisen tot founder <i>(Er zijn geen dieren met een aangetast fenotype geconstateerd.)</i>	Nee	Nee	Ja*)	*) In registratie GW/gewoon proefdieren
	Uitkruisen tot founder <i>(Er zijn dieren met een aangetast fenotype geconstateerd)</i>	Ja	Ja**)	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren **) In registratie GW dierproeven

1 Actie: Creëren nieuw genotype		Project vergunning plichtig	In registratie Dierproeven	In registratie proefdieren	Toelichting
	Nakomelingen van founder (F1 en verder) <i>Er zijn geen dieren met een aangetast fenotype geconstateerd.</i>	Nee	Nee	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren
	Nakomelingen van founder (F1 en verder) <i>Er zijn in de monitoring van de eerste twee generaties dieren met een aangetast fenotype geconstateerd</i>	Ja	Ja**)	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren **) In registratie GW dierproeven
D. Biotechnologie	Zoogdieren: Eiceldonor♀, stud ♂, gevasectomeerde ♂, Foster ♀	Ja	Ja*)	Ja*)	Bij de bij het creëren van een nieuw genotype betrokken dieren is sprake van een bovendrempelige welzijnsaantasting *) In registratie 'gewoon' dieren/dierproeven
	Vissen: Wt Eiceldonor♀, Wt stud ♂,	Nee	Nee	Ja*)	Bij de bij het creëren van een nieuw genotype betrokken dieren is geen sprake van een bovendrempelige welzijnsaantasting *) In registratie 'gewoon' dieren/dierproeven
	nakomelingen (F1 en verder) <i>Er is niet de verwachting op dieren met een aangetast fenotype en het is ook na twee generaties monitoren niet geconstateerd.</i>	Nee	Nee	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren

1	Actie: Creëren nieuw genotype	Project vergunning plichtig	In registratie Dierproeven	In registratie proefdieren	Toelichting
	Nakomelingen (F1 en verder) <i>Er is de verwachting op een aangetast fenotype of dit is in de monitoring van de eerste twee generaties geconstateerd</i>	Ja	Ja**)	Ja*)	*) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren **) In registratie GW dierproeven

Algemeen:

Het fokken met een nieuw genotype is niet vergunningplichtig als er vooraf geen uitzicht is op een aangetast fenotype of totdat aangetoond is dat er bij deze fok sprake is van dieren met een aangetast fenotype.

2	Actie: Importeren/saneren van een lijn	Project vergunning plichtig	In registratie dierproeven	In registratie proefdieren	Toelichting
	Saneren van een foklijn (Eicel/embryo, sperma donoren, stud ♂, gevasectomeerde ♂, Foster ♀) Importeren van een foklijn via geïmporteerde embryo's/sperma waarbij uiteindelijk embryo's geïmplanteerd worden in fosters.	Nee	Nee	Ja	Handelingen aan dieren zijn onderdeel van bedrijfsvoering (vallen buiten kaders Wod en zijn dus niet vergunningplichtig) <i>Artikel 1.b.7.d</i> <i>Deze wet is niet van toepassing op:</i> <i>d. praktijken ten behoeve van de reguliere dierhouderij;</i> *)GW dieren in dierproef/proefdier registratie GW dieren *) Wt dieren in dierproef/proefdier registratie 'gewone' dieren

	Nee	Nee	Ja	<p>Handelingen aan dieren zijn onderdeel van bedrijfsvoering (vallen buiten kaders Wod en zijn dus niet vergunningplichtig)</p> <p><i>Artikel 1.b.7.d</i></p> <p><i>Deze wet is niet van toepassing op:</i></p> <p><i>d. praktijken ten behoeve van de reguliere dierhouderij;</i></p> <p>*) GW dieren in dierproef/proefdier registratie GW dieren</p> <p>*) Wt dieren in dierproef/proefdier registratie 'gewone' dieren</p>
--	-----	-----	----	--

3	Actie: Genotyperen	Project vergunning plichtig	In registratie dierproeven	In registratie proefdieren	Toelichting
	Genotyperen in combinatie met identificeren (muis/rat) Common practice: oorknip, teenknip Opmerking: Ook hernieuwde monsternamen na instemming van IvD.	Nee	Nee	Ja*)	<p><u>Conform corrigendum</u></p> <p>*) In registratie GW/gewoon proefdieren</p> <p>*) In registratie 'gewoon' dieren</p> <p><i>NB</i></p> <p><i>Geldt ook in gevallen waarbij er bij dit genotyperen sprake is van 'common practice' en dit genotyperen gepaard gaat met bovendrempelig ongerief voor de betrokken dieren</i></p>
	Genotyperen niet in combinatie met identificatie: bloedmonster, staartknip (muis/rat)	Ja	Ja**)	Ja*)	<p><u>Conform corrigendum</u></p> <p>*) In registratie GW/gewoon proefdieren</p> <p>***) In registratie GW/gewoon dierproeven</p>

Genotyperen (vis): common practice: combinatie genotyperen en identificeren is niet mogelijk	Nee	Nee	Ja*)	<u>Afwijkend van corrigendum</u> Een enorme toename van het aantal dierproeven en op grote schaal hergebruik registratie worden op deze wijze voorkomen *) In registratie GW/gewoon proefdieren <i>NB</i> <i>Geldt ook in gevallen dit genotyperen gepaard gaat met bovendrempelig ongerief voor de betrokken dieren</i>
--	-----	-----	------	--

4	Actie: Monitoren fenotype	Project vergunning plichtig	In registratie dierproeven	In registratie proefdieren	Toelichting
	Monitoring fenotype op een constitutionele welzijnsaantasting	Nee	Nee	Ja*)	Er is bij de monitoring geen sprake van drempel overschrijdend ongerief. *) In registratie GW proefdieren
	Monitoring fenotype op een constitutionele welzijnsaantasting. De monitoring vindt plaats bij zeer oude dieren waarbij er ten gevolge van de veroudering sprake is van drempel overschrijdend ongerief.	Ja	Ja**)	Ja*)	*) In registratie GW proefdieren **) In registratie GW dierproeven
	Monitoring fenotype op een constitutionele welzijnsaantasting. Onderdeel van de monitoring zijn handelingen die bij de dieren resulteren in drempel overschrijdend ongerief. Voorbeelden: Bloedafnames, 'belastende' gedragstesten', plaatsing in metabolisme kooien etc.	Ja	Ja**)	Ja*)	*) In registratie GW proefdieren **) In registratie GW dierproeven

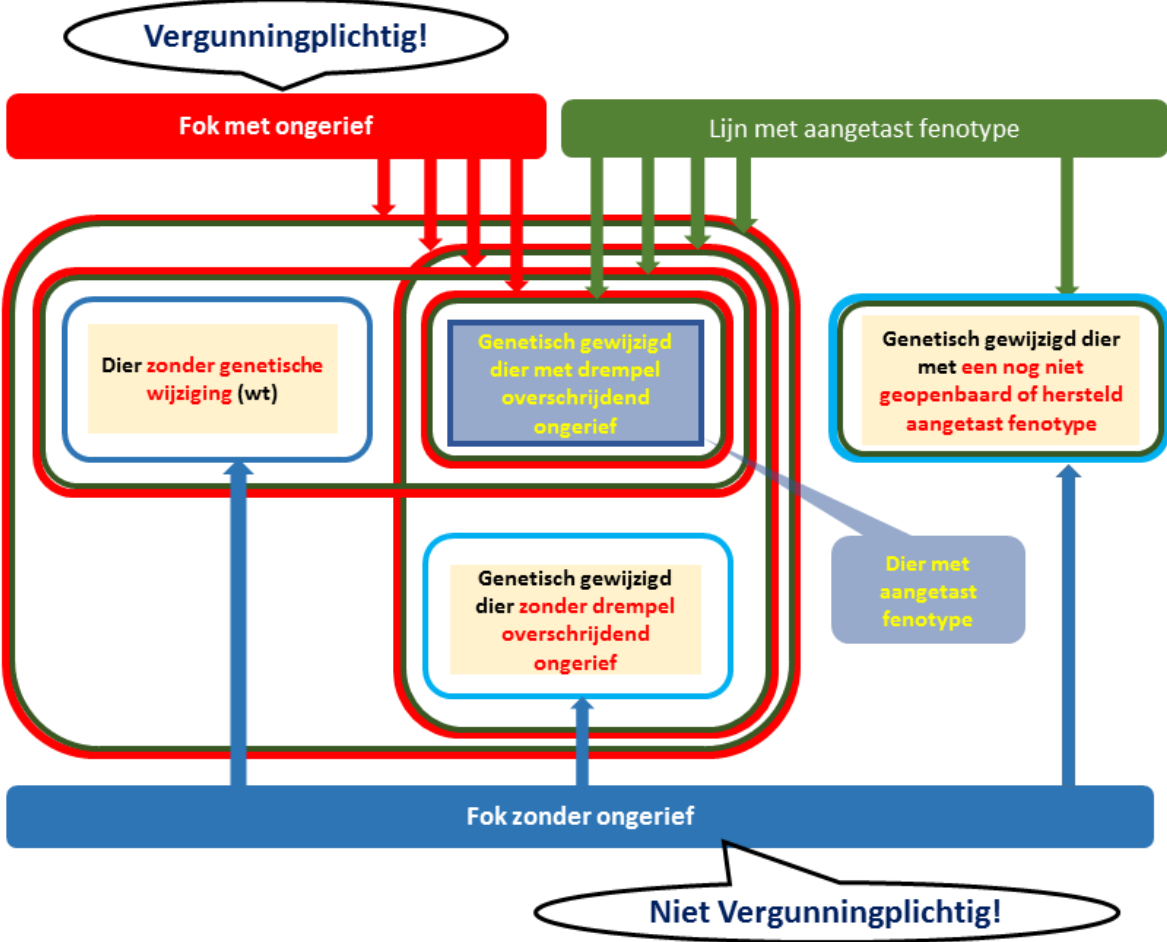
5 Actie: Aanhouden lijn		Project vergunning plichtig	In registratie dierproeven	In registratie proefdieren	Toelichting
Fok zonder ongerief met een 'established' GW lijn zonder aangetast fenotype		Nee	Nee	Ja*)	Fok zonder ongerief ' *) Wt dieren In registratie 'Gewoon' *) In registratie GW proefdieren
Fok met een 'established' lijn waar op latere leeftijd sprake is van welzijnsaantasting (bijv ontwikkelen van tumoren), maar de dieren in de fok deze leeftijd niet bereiken		Nee	Nee	Ja*)	Fok zonder ongerief met een lijn met een aangetast fenotype <u>Afwijkend van corrigendum</u> *) In registratie GW/gewoon proefdieren
Fok met een 'established' lijn waar aantasting van welzijn zou kunnen optreden (bv immuundeficiënte lijnen) maar die onder gecontroleerde omstandigheden worden gehouden of waarbij door 'rescuemaatregelen' de kans op welzijnsaantasting nihil is		Nee	Nee	Ja*)	Fok zonder ongerief met een lijn met een aangetast fenotype <u>Afwijkend van corrigendum</u> *) In registratie GW/gewoon proefdieren
Fok met ouderdieren zonder ongerief, maar (deel van) nakomelingen met ongerief. <i>(Bijvoorbeeld heterozygoot x heterozygoot kruisingen waarbij ook homozygote dieren met een aangetast fenotype ontstaan)</i>	Ouderdieren	Nee	Nee	Ja*)	Fok met ongerief <u>Afwijking van discussionpaper consistent reporting:</u> Let op bij registratie: indien genotyperen alleen voor registratiedoeleinden moet worden gedaan dan wordt het hele nest (ook de WT dieren) als GW geregistreerd. *) In GW registratie proefdieren **) In GW registratie dierproeven
	GW nakomelingen (geen aangetast fenotype)	Nee	Nee	Ja*)	
	GW nakomelingen (met aangetast fenotype)	Ja	Ja**)	Ja*)	
	Wt nakomelingen	Nee	Nee	Ja	
Fok met ouderdieren met	Ouderdieren	Ja	Ja	Ja*)	Fok met ongerief

5 Actie: Aanhouden lijn		Project vergunning plichtig	In registratie dierproeven	In registratie proefdieren	Toelichting
aangetast fenotype en (deel van) nakomelingen met ongerief.	GW nakomelingen (geen aangetast fenotype)	Nee	Nee	Ja*)	<u>Afwijking van discussionpaper consistent reporting:</u> Let op bij registratie: indien genotyperen alleen voor registratiedoeleinden moet worden gedaan dan wordt het hele nest (ook de WT dieren) als GW geregistreerd. *) In GW registratie proefdieren **) In GW registratie dierproeven
	GW nakomelingen (met aangetast fenotype)	Ja	Ja**)	Ja*)	
	Wt nakomelingen	Nee	Nee	Ja	

6 Actie: Bedrijfsvoering	Project vergunning plichtig	In registratie dierproeven	In registratie proefdieren	Toelichting
Invriezen lijn/ controle op succes invriezen	Nee	Nee	Ja*)	Handelingen aan dieren zijn onderdeel van bedrijfsvoering (vallen buiten kaders Wod en zijn dus niet vergunningplichtig) <i>Artikel 1.b.7.d</i> <i>Deze wet is niet van toepassing op:</i> <i>d. praktijken ten behoeve van de reguliere dierhouderij;</i> *) In GW/gewoon registratie proefdieren
Ontdooien lijn	Nee	Nee	Ja*)	Handelingen aan dieren zijn onderdeel van bedrijfsvoering (vallen buiten kaders Wod en zijn dus niet vergunningplichtig) <i>Artikel 1.b.7.d</i> <i>Deze wet is niet van toepassing op:</i> <i>d. praktijken ten behoeve van de reguliere dierhouderij;</i> *) In GW/gewoon registratie proefdieren

Het invoeren van een foklijn in een instituut waarbij in het kader van de sanering handelingen uitgevoerd moeten worden	Nee	Nee	Ja*)	Handelingen aan dieren zijn onderdeel van bedrijfsvoering (vallen buiten kaders Wod en zijn dus niet vergunningplichtig) <i>Artikel 1.b.7.d</i> <i>Deze wet is niet van toepassing op:</i> <i>d. praktijken ten behoeve van de reguliere dierhouderij;</i> *) In GW/gewoon registratie proefdieren
Fok (zonder ongerief) voor productie/uitbreiden fok om aantallen voor experiment te halen	Nee	Nee	Ja*)	Handelingen aan dieren zijn onderdeel van bedrijfsvoering (vallen buiten kaders Wod en zijn dus niet vergunningplichtig) <i>Artikel 1.b.7.d</i> <i>Deze wet is niet van toepassing op:</i> <i>d. praktijken ten behoeve van de reguliere dierhouderij;</i> *) In GW/gewoon registratie proefdieren
Sentinel dieren	Nee	Nee	Ja*)	Handelingen aan dieren zijn onderdeel van bedrijfsvoering (vallen buiten kaders Wod en zijn dus niet vergunningplichtig) <i>Artikel 1.b.7.d</i> <i>Deze wet is niet van toepassing op:</i> <i>d. praktijken ten behoeve van de reguliere dierhouderij;</i> *) In GW/gewoon registratie proefdieren

VIII.Overzichtschem



IX. Annex welfare assessment

Key Elements of a GA Rodent Welfare Assessment Scheme

Include animals of representative age groups

- soon after birth, around weaning and again following sexual maturity*)
- a minimum of 7 males and 7 females sampled from more than one litter
- data from a minimum of two breeding cycles (from F2 onwards)
- Comparisons made wherever possible with similar non GA animals.

*) and at additional time points as considered appropriate by a prospective review of the potential impact of the gene alteration e.g. where there is an age dependent onset of disease

CRITERIA	WHAT TO LOOK FOR
Overall Appearance	Is the animal morphologically 'normal'? Are there any malformations or any other indicators that the phenotype has been affected? For example skeletal deformity or hydrocephalus.
Size, conformation and growth	Are there any deviations from expected size or growth curve?
Coat condition	Is there any piloerection, areas of fur loss, loss of whiskers, barbering? Is the skin / fur in good condition?
Behaviour –Posture, gait, activity and interactions with the environment	Do they exhibit the full repertoire of behaviours appropriate for the strain/species, including social interactions, grooming, walking, running, digging, climbing? Are these normal? Is the animal hunched or reluctant to move? Is movement impaired or is there any difficulty with orientation? Any signs of rigidity or tremors? Any abnormal activity levels? Prolonged inactivity could indicate chronic stress or depression (anhedonia) and/or sickness/pain, particularly if linked with a hunched posture and/or rough or unkempt coat. Unusual activity, such as hyperactivity, could indicate stereotypy or other behavioural abnormality
Clinical signs	For example - nasal or ocular discharge, swollen or closed eyes; increased respiratory rate; dyspnoea; seizures/twitches/tremors; increased vocalisation with handling; overgrown teeth; presence of tumours, neurological or musculoskeletal abnormalities. Is metabolism impaired, for example, increased or decreased food or water intake, excessive urination? Consistency of faeces.
Relative size	Any unusual changes in size of the animals should be noted, and comparisons made within the litter. It may be helpful to generate a growth curve for the line
Numbers	Where death occurs, it is important to maintain accurate records such that any pre- or post-weaning losses can be investigated. Where appropriate (e.g. higher than anticipated mortality rate), post mortem examinations should be carried out to help determine the cause of death. A review of fertility can also be helpful in assessment of whether or not the modification is having an effect e.g. conception rates; abortions; stillbirths.

Additional considerations for assessment in Neonatal animals	
CRITERIA	WHAT TO LOOK FOR
Colour of pups (for neonate only)	Do any pups show evidence of abnormal skin colour (e.g. anaemia, poor circulation)
Activity of pups (for neonate only)	Any abnormal activity, e.g. reduced wriggling? Righting reflex intact?
Milk spot (for neonate only)	Do any pups fail to show presence of a milk spot? Any evidence of mis-mothering?
Litter	Litter sizes; litter homogeneity; development and growth of pups

X. Artikelen

1. Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes
2. Uitvoeringsbesluit van de commissie tot vaststelling van een gemeenschappelijk format voor de indiening van de informatie overeenkomstig Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt. (14 november 2012) (Kennisgeving nummer C(2012) 8064) (2012/707/EU) (PB L 320 van 17.11.2012, blz. 33)
3. Caring for animals: aiming for better science: Working document on a severity assessment framework (11-12 July 2012)
4. CORRIGENDUM Working document on genetically altered animals (23-24 January 2013)
5. Wijziging van de Wet op de dierproeven in verband met implementatie van richtlijn 2010/63/EU
6. Besluit van 26 november 2014 tot uitvoering van de Wet op de dierproeven (Dierproevenbesluit 2014)
7. Regeling van de Minister van Economische Zaken van 3 december 2014, nr. WJZ / 13149501, tot uitvoering van de Wet op de Dierproeven en het Dierproevenbesluit 2014 (Dierproevenregeling 2014)
8. Discussion paper for the purposes of promoting consistent reporting of statistical data (actual severity and animal numbers) under Article 54(2) of Directive 2010/63/EU and Commission Implementing Decision 2012/707/EU - January 2016 -